

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Construction of Heterofunctional Nanosheets with Different
Cyto compatibilities in Two Sides and
Application as an Anti-adhesion Barrier

表裏で異なる細胞親和性を持つナノシートの調製と
癒着防止剤としての応用

申 請 者

丹羽	大輔
Daisuke	Niwa

生命医科学専攻 生体分子集合科学研究

ナノテクノロジーやナノマテリアルによる近年の技術革新は目覚しく、エレクトロニクス、オプトニクスなどの産業において様々な製品に応用されている。また、バイオテクノロジーとも融合したナノバイオテクノロジーへの進展も顕著であり、医工連携の下、各種診断法、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、再生医療工学分野において革新的な診断・治療法が提唱されている。Langer が人間の耳を形取ったポリ乳酸をマウスに埋め込み、生分解性高分子を組織再生の足場として用いた研究に端を発し、岡野らは温度応答性高分子を被覆したシャーレから細胞シートを作製し、角膜や心筋の損傷部に移植して組織再生させる「細胞シート工学」に至る一連の技術の進展は、iPS 細胞から自己の組織や臓器を構築して移植する近未来の個別化医療の核心に迫るものである。他方、申請者の所属研究室では、生分解性及び生体適合性を兼備した厚さ数十ナノメートルからなる高分子超薄膜(ナノシート)を新しい概念の医用材料として展開しており、動物実験により外科的処置後の癒着防止機能を持つ創傷被覆材としての良好な知見を集積している。この生分解性・生体適合性のある医用高分子材料からなるナノシートの特徴は、超薄膜であることによる巨大アスペクト比($>10^6$)、それ故の高い柔軟性と高い接着性、極少量で大面積の患部を被覆できるメリットやコストメリットなどが挙げられる。短時間で大量調製や滅菌が可能であり、緊急時にも対応可能で誰にでも幅広い用途で安価に利用できる創傷被覆材として細胞シートとは異なる展開が見込まれる。

当研究室ではポリカチオンとポリアニオンを交互積層させることにより得られるポリイオンコンプレックスナノシート(キトサン/アルギン酸、コラーゲン/ヒアルロン酸など)とポリ乳酸(PLLA)などの高分子溶液からスピコートにより得られるナノシートを作成して、それぞれ肺損傷モデルや胃切開モデルにおいて創傷被覆材としての有用性を立証している。ナノシートは表裏面で異なる性質を兼備できるが、未だその検討はなされていない。そこで本論文では表裏面で異なる生体親和能を持つナノシートの構築と癒着防止能の評価ならびに止血材との併用によるナノシートの医療用途について評価を行った結果をまとめた。

本論文は 6 章から構成されている。第 1 章は序論、第 2 章ではナノシート上における細胞接着性、第 3 章では止血能を有するトロンビン担持ナノシートの開発とその肝臓多量出血モデルにおける止血能及び癒着防止能評価、第 4 章では表裏面でヘテロな機能を持つナノシートの作製とその表面構造及び物性評価、第 5 章では止血材とナノシートの併用モデルにおけるナノシートの癒着防止能に関する評価、そして第 6 章では本論文の結論とナノシートの将来展望について述べた。各章の概説は以下の通りである。

第 1 章では、ナノシートの基礎である高分子の自己組織化現象に関して、その原理、自己組織化によるナノ構造体の構造とそれに由来する物性に関して従来の

研究を調査した結果をまとめた。また、ナノ構造体を構築するためのナノテクノロジーの展開、特に高分子超薄膜の製造や応用展開、更には所属研究室におけるナノシート開発の動向をまとめ、本論文の研究の位置付けを明確にした。

第2章ではナノシート上での細胞接着性を評価した。現在ナノシートと胃や肺等の臓器との相互作用に関する知見は集積されているものの、細胞との親和性に関する評価はなされていない。そこでマウスの線維芽細胞 NIH3T3 をポリ乳酸ナノシート(PLLA)上に播種したところ非細胞接着性が明らかとなり、動物実験にて示された臓器との高密着性は物理吸着によるものであることが示唆された。

第3章では、トロンビン(Thr)を PLLA にコートした止血能担持ナノシート(Thr-PLLA)の構築に関する検討を行い、肝臓多量出血モデルにて評価を行った。動物実験では PLLA と Thr-PLLA には有意差は認められず、疎水性 PLLA の表面に親水性球状タンパクの Thr を担持させることの難しさや多量出血時におけるナノシート単独貼付の問題点に関する知見を得た。

第4章では、高機能性ナノシートとして、表裏面で異なる細胞親和性を持つナノシートの調製ならびにその特性について記述した。PLLA ナノシートは細胞接着性を持たないことから、細胞接着の観点からコラーゲンを修飾することで細胞接着性と非細胞接着性を併せ持つナノシートの構築を目的とした。細胞接着能を期待してコラーゲンを修飾した面を臓器損傷面に、そしてコラーゲンを修飾していないポリ乳酸の面を裏面に用いることで、損傷部に対しては創傷治癒のための組織形成の足場として機能し、逆面は従前より確認されている癒着防止能を併せ持つ癒着防止能を持つ新しい創傷被覆材の開発が見込まれる。更に、修飾したコラーゲンの高次構造が細胞接着特性に及ぼす影響を明らかにするために、コラーゲンのキャスト膜(Col-Cast-PLLA)とスピコート膜(Col-Spin-PLLA)について細胞親和性を検討した。Col-Cast-PLLA では、コラーゲンの均一な表面修飾は困難であった。これは疎水性のポリ乳酸ナノシートに親水性のコラーゲンをキャストした際、コラーゲンの自己集合能が、コラーゲンと基板との相互作用よりも強いためと考えられる。他方、Col-Spin-PLLA を原子間力顕微鏡により観察したところ、5~10nm 程度の薄いコラーゲン層が均一に形成されていた。また、接触角の測定から Col-Spin-PLLA が Col-Cast-PLLA よりも親水性であった。細胞培養の条件では、インキュベーション時間とともに Col-Cast-PLLA はコラーゲン特有の三重螺旋構造が巨大化していくのに対し、Col-Spin-PLLA は表面構造の変化は認められなかった。これは、Col-Spin-PLLA 上のコラーゲン担持量が極めて少ないために、コラーゲンが自己集合できないためと考えられる。また、細胞接着性、細胞接着面積、細胞内アクチンフィラメントの伸張のいずれも、Col-Spin-PLLA は Col-Cast-PLLA よりも良好な結果を得た。そこで、Col-Spin-PLLA を表裏折り重ねた状態で細胞を播種したところ、ポリ乳酸側では細胞接着性は示さずコラーゲン修飾側で細胞接着が確認された。今後新規創傷治癒材料への展開が見込まれる。

第5章では、多量出血を伴う臓器損傷時における、止血材とナノシートの併用による実用的な医療応用について検討した。胃切開モデル、肺気胸モデルなどの知見からナノシートの癒着防止性についての可能性が示されている。しかしながら、肝臓や腎臓などの血液や浸出液が多量に流出する部位での創傷被覆材としての検討はなされていない。多量出血を伴う臓器の損傷においては、フィブリンから成る止血材を用いるのが一般的であり、タココンブ(TachoComb)の製品名で広く臨床使用されているが、術後癒着などの副作用を引き起こすことが知られている。術後癒着はイレウスや不妊、骨盤痛など重篤な副作用を伴い、特に腸閉塞などは死亡の原因ともなりうる。他方、癒着防止材として SepraFilm などの優れた癒着防止材が臨床使用されている。しかしながら、癒着防止能は充分とは言えず、特にタココンブとの併用においては、厚みが大きいことによる物理的接着性の低減などが要因で困難との指摘がなされている。本章では肝臓損傷多量出血モデルにおいてタココンブとナノシートの併用モデルについて、ナノシートの癒着防止能に関する評価を行った。具体的には Slc:SD ラット(8~9 週齢)の肝臓に直径 1.5cm 程度の穴を開け、タココンブを貼付して止血を行った後にポリ乳酸ナノシートを被覆し、術後 5 日における癒着スコアを 4 段階に分けて評価した。なお、肝臓に穴を開けたのみ(未処置)をコントロールとした。未処置群及びタココンブ貼付群(TachoComb)に関しては強固な癒着が確認され、ポリ乳酸とタココンブの併用型(TachoComb+PLLA)に関しては癒着の軽減が認められた。また病理切片(H&E 染色)からは未処置群及び TachoComb 群では繊維芽細胞・炎症細胞の浸潤が認められ、TachoComb+PLLA 群ではナノシートは目視での確認はできないものの、繊維芽細胞や炎症細胞の浸潤が阻止されていた。走査型電子顕微鏡では、ナノシートの存在が血球細胞及び繊維芽細胞の浸潤を阻止していた。以上の結果から、細胞親和性の低い PLLA が癒着防止能を発現していると考えられる。しかしながら 14 日後では TachoComb+PLLA 群でも癒着が認められた。PLLA ナノシート表面の至るところに小さな穴が認められ、ナノシートが分解していた。これが癒着亢進に直接関係があると考えられ、タココンブ使用時に癒着を併発しないためには、タココンブより分解の遅い生分解性高分子からなる生体適合性ナノシートの開発が課題であることを明らかにした。

第6章では、本論文の総括と将来展望について述べた。本論文では、疎水性相互作用などのソフトな結合により、従来困難であるポリ乳酸上での親水性タンパク質担持を可能とし、細胞接着性において、表裏面で異なる機能を兼ね備えた均一な新規ナノシートを構築し、その機能を *in vitro* にて評価した。更に、多量出血を伴う臓器損傷時におけるナノシート単独貼付の問題点を明らかにするとともに、止血材との併用モデルにおいて、ナノシートが癒着防止バリアーとして機能し得ることを *in vitro* 及び *in vivo* 評価系から確認した。最後に医用材料として期待される新規機能性超薄膜に関する将来展望を纏めた。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 丹羽 大輔 印

(2010 年 11 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文 原著	
1.	“Heterofunctional nanosheet controlling cell adhesion properties by collagen coating”, <i>J. Biomater. Appl.</i> , (印刷中). <u>Daisuke Niwa</u> , Toshinori Fujie, Throsten Lang, Nobuhito Goda, Shinji Takeoka.
2.	“A nano-fibrous assembly of collagen-hyaluronic acid for controlling cell-adhesive properties”, <i>Soft Matter</i> , 6 , 4672-4676 (2010). Toshinori Fujie, Sho Furutate, <u>Daisuke Niwa</u> , Shinji Takeoka.
2. 講演	A. 国際会議での講演発表
1.	“Analysis of the interaction between cells and the different types of nanosheets”, American Chemical Society 239th National Meeting & Exposition, San Francisco, 2010 年 4 月, <u>Daisuke Niwa</u> , Toshinori Fujie, Throsten Lang, Nobuhito Goda, Shinji Takeoka.
2.	“The analysis of ‘nano-adhesive plaster’ in the molecular biological way”, The 3rd Global COE International Symposium on ‘Practical Chemical Wisdom’, Tokyo, 2009 年 1 月, <u>Daisuke Niwa</u> , Nobuhito Goda, Thorsten Lang, Shinji Takeoka.
3.	“The analysis of the interaction between Cells and Hetrofunctional Nanosheets”, The 4th Global COE International Symposium on ‘Practical Chemical Wisdom’, Tokyo, 2010 年 1 月, <u>Daisuke Niwa</u> , Nobuhito Goda, Thorsten Lang, Shinji Takeoka.
4.	“Application of nanosheet as an anti-adhesion barrier in liver defect model.”, The 2nd NIMS (MANA)-Waseda Interventional Symposium, Tsukuba, 2010 年 12 月, <u>Daisuke Niwa</u> , Masatsugu Koide, Toshinori Fujie, Yosuke Okamura, Nobuhito Goda, Shinji Takeoka.
1.	B. 学会関連での講演発表 「物性の異なる高分子超薄膜の構築と細胞との相互作用解析」日本化学会 第 3 回関東支部大会 (2009 年 9 月, 東京) <u>丹羽大輔</u> , 藤枝俊宣, 合田亘人, 武岡真司
2.	「細胞接着性表面を有する自己支持性コラーゲン/ヒアルロン酸ナノシートの構築」日本化学会 第 3 回関東支部大会 (2009 年 9 月, 東京) 古舘祥, 藤枝俊宣, <u>丹羽大輔</u> , 武岡真司
3.	「細胞接着性コラーゲン/ヒアルロン酸ナノシートの構築」第 31 回日本バイオマテリアル学会大会 (2009 年 11 月, 京都) 古舘祥, 藤枝俊宣, <u>丹羽大輔</u> , 武岡真司

早稲田大学 博士（◇◇学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）

早稲田大学 博士（◇◇学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）